Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 4, Oct- Nov 2020, p. 493-505

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 4، مهر - آبان 1399، ص. 505-493

مقاله کوتاه پژوهشی

اثر پوشش فعال کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی بر خواص شیمیایی و میکروبی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی دوره نگهداری در دمای یخچال

سهیل ریحانی پول[1]- سید علی جعفرپور[2]*

تاریخ دریافت: 1398/05/08
تاریخ پذیرش: 1398/07/03

چکیده

به دنبال انجام تحقیقات گسترده در زمینه خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی و کیتوزان و رضایت‌بخش بودن نتایج، استفاده کاربردی از این ترکیبات به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی مختلف ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف از مطالعه حاضر نیز بررسی خواص این ترکیبات در نگهداری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دمای یخچال است. به همین منظور، فیله‌های ماهی با محلول کیتوزان (تیمار 2) و کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی (تیمار 3) پوشش داده شدند و به همراه شاهد (تیمار 1) در روزهای صفر، 4، 8، 12، 16 و 20 نگهداری در یخچال مورد آزمون‌های شیمیایی و میکروبی قرار گرفتند. نتایج آزمون‌های شیمیایی نشان داد که مقادیر شاخص‌های TBA، TVN-B و FFA ضمن داشتن روند افزایشی در طول دوره، در اکثر روزهای مورد بررسی (به‌خصوص روزهای پایانی) به‌صورت معنی‌داری در تیمار 3 کمتر از تیمارهای 1 و 2 بود ($p<0/05$). شاخص PV هم در روزهای 12، 16 و 20 در تیمار 3 به‌صورت معنی‌داری از تیمار 1 و 2 کمتر بود اما روند افزایشی مستمر با افزایش زمان نگهداری در این شاخص ثبت نشد؛ بلکه در پایان دوره (روز 20) این شاخص در هر سه تیمار نسبت به روز 16 کاهش یافت. یافته‌های تغییرات pH حاکی از ثبات این شاخص در تیمار 3 در طول دوره نگهداری بود. ضمن اینکه در روزهای 12، 16 و 20، pH تیمار 3 به‌صورت معناداری کمتر از تیمار 1 و 2 بود ($p<0/05$). شمارش بار باکتریایی مزوفیل هوازی و سرمادوست در تیمارها (ضمن داشتن روند افزایشی در طول دوره) نشان داد که در روزهای 8، 12، 16 و 20 بار باکتریایی تیمار 3 به‌طور معناداری کمتر از تیمار 1 و 2 است ($p<0/05$). بنابراین می‌توان بیان نمود که پوشش فعال کیتوزان به همراه پپتیدهای زیست‌فعال قابلیت حفظ کیفیت فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره نگهداری در دمای یخچال را دارد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین آبکافتی، کیتوزان، خواص ضدباکتریایی، خواص آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

پوشش‌های خوراکی (فیلم) یکی از اشکال نگهداری مواد غذایی مختلف در طول دوره نگهداری در یخچال هستند (زرگر و همکاران، 1393؛ ساکی و همکاران، 1396؛ اجاق و همکاران، 1391). این فیلم‌ها لایه‌ای نازک از مواد خوردنی شیمیایی و یا طبیعی با فاز مایع می‌باشند که پس از غوطه‌وری ماده غذایی مورد نظر در آن‌ها، به شکل یک پوشش اطراف ماده را احاطه می‌کنند. مهم‌ترین موادی که در تولید این فیلم‌ها کارایی دارند، دارای جنس و پایه پروتئینی، پلی‌ساکاریدی و یا لیپیدی هستند. با توجه به اینکه نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی به حفظ سلامت مصرف‌کنندگان کمک می‌کنند و از این رو تقاضا برای این نوع مواد غذایی به دلیل کیفیت بهتر و ایمنی بیشتر رو به افزایش است، انجام تحقیقات در زمینه نگهدارنده‌های طبیعی دارای قابلیت تشکیل فیلم و غنی‌سازی آن‌ها با ترکیبات فعال، مفید و ضروری به‌نظر می‌رسد.

کیتین پلیمر بلندی از ان-استیل گلوکزآمین است که غالبا در دیواره سلولی قارچ‌ها و اسکلت خارجی سخت‌پوستان دریایی یافت می‌شود و بعد از سلولز، فراوان‌ترین پلیمر زیستی در طبیعت است (Peniche *et al.*, 2008). از استیل‌زدایی کیتین، کیتوزان حاصل می‌شود که به دلیل خواص منحصر به فرد، در صنعت غذا و دارو کاربرد فراوانی دارد. این ترکیب غیرسمی، بی‌طعم، آنتی‌اکسیدان و ضدمیکروب در برابر عبور اکسیژن نفوذناپذیر است (Joen *et al.*,

1- دانشجوی دکتری، گروه آموزشی فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
2- دانشیار، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.
(*-نویسنده مسئول: Email: a.jafarpour@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i4.82198

2002; Lopez-Caballero *et al*., 2005). مطالعات گسترده‌ای در رابطه با خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی کیتوزان انجام گرفته است که نتایج اکثر این تحقیقات بر نقش موثر کیتوزان در نگهداری مواد غذایی مختلف در قالب پوشش (فیلم) دلالت دارند (اجاق و همکاران، 1391؛ جدی و همکاران، 1395؛ ساکی و همکاران، 1396؛ آلبوغبیش و خدانظری، 1396؛ Joen و همکاران، 2002؛ Lopez-Caballero و همکاران، 2005؛Li و همکاران، 2012؛ Fan و همکاران، 2009؛ Zarei و همکاران، 2015). مکانیسم عمل کیتوزان برای اعمال این خواص مشخص است. خاصیت ضدباکتریایی کیتوزان مربوط به بار مثبت این بیوپلیمر است که در برخورد با بار منفی غشای سلول‌های باکتری‌ها موجب خروج بخش‌های حیاتی سلول و نابودی آن می‌شود (No *et al*., 2007). خاصیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان مربوطه به فعالیت گروه‌های آمینوی اولیه آن می‌باشد. به این صورت که این گروه‌ها با گروه‌های آلدهیدی فراری که از اکسیداسیون چربی‌ها ایجاد می‌شوند یک میکرواسفر پایدار تشکیل می‌دهند. علاوه بر این عامل، توانایی کیتوزان در کلاته‌کردن یون‌های فلزی، این بیوپلیمر را به یک آنتی‌اکسیدان طبیعی و قوی تبدیل کرده است (Mohan *et al*., 2012).

مواد طبیعی دیگری با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی وجود دارند که به تنهایی قابلیت بالایی برای ایجاد فیلم و پوشش ندارند اما در ترکیب با فیلم کیتوزان (غنی‌سازی کیتوزان)، خواص آن را تشدید می‌کنند. اسانس‌های برخی از گیاهان مانند مرزنجوش (جدی و همکاران، 1395)، دارچین (اجاق و همکاران، 1389)، رزماری (Li و همکاران، 2012) و.. از این دسته از مواد طبیعی می‌باشند.

پروتئین‌های آبکافتی (هیدرولیزشده) که در واقع از تجزیه و شکستن مولکول‌های پروتئینی طی فرآیند آبکافت حاصل می‌شوند خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. در تحقیقات زیادی این خاصیت پروتئین‌های آبکافتی تست و نتایج مثبتی گزارش شد (ریحانی و همکاران، 1397؛ طاهری و بیتا، 1389؛ بخشان و همکاران، 1393؛ Jun *et al*., 2004؛ Wu *et al*., 2003؛ Klompong *et al*., 2007؛ Elavarasan *et al*., 2014؛ Souissi *et al*., 2007). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی به عواملی همچون درجه آبکافت، وزن مولکولی و زمان فرایند آبکافت بستگی دارد (ریحانی و جعفرپور، 1396؛ Dong و همکاران، 2008). پروتئین‌های آبکافتی دارای پپتیدهای زیست‌فعالی هستند که در توالی اصلی پروتئینی خود غیرفعال‌اند اما پس از رهاشدن از زنجیره پروتئینی توسط فرایند آبکافت، فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی از جمله خواص ضدمیکروبی از خود بروز می‌دهند. این پپتیدها معمولا از 2 تا 20 آمینواسید تشکیل شده‌اند که وزن آن‌ها کمتر از 6000 دالتون است (Kim & Wijesekara, 2010؛ Sila و همکاران، 2014؛ علی‌نژاد و همکاران، 1395). اعتقاد بر این است که پروتئین‌های آبکافتی از طریق ایجاد منافذی در غشای سلولی باکتری، منجر به نابودی سلول می‌شوند (Amissah, 2012). آبگریزی، pH، قدرت یونی، دما، سورفاکتانت‌ها، منشا پپتید، ترکیب اسیدآمینه، بار الکتریکی پپتید و ساختار ثانویه آن از جمله عواملی هستند که فعالیت ضدمیکروبی پروتئین‌های آبکافتی (پپتیدهای زیست‌فعال) را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Shahidi and Zhong, 2008).

هم کیتوزان و هم پروتئین‌های آبکافتی می‌توانند از ضایعات آبزیان تولید شوند. بنابراین کارنجات بسته‌بندی آبزیان و مراکز عرضه به‌جای دور ریز ضایعات و آلودگی محیط زیست، می‌توانند آن‌ها را از طریق فرایندهای مختلف به موادی با ارزش افزوده بالا تبدیل و در صنایع غذایی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای نگهدارنده‌های مصنوعی و سنتتیک به‌کار گیرند. مطالعات محدودی در مورد استفاده از پروتئین‌های آبکافتی در فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر و طبیعی انجام شده است. Morais و همکاران (2017) گزارش کردند استفاده از پروتئین آبکافتی حاصل از ماهی (*Micropogonias furnieri*) در فیلم کیتوزان موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم می‌شود. نتایج پژوهش Da Rocha و همکاران (2018) نشان داد که استفاده از پروتئین‌های آبکافتی ماهی (*Umbrina canosai*) در فیلم آگار موجب کنترل pH و بازهای ازته فرار در فیله ماهی (*Paralichthys orbignyanus*) نگهداری‌شده در دمای 5 درجه سانتی‌گراد نسبت به شاهد می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر، لعاب‌دهی فیله ماهی سالمون صورتی (*Oncorhynchus gorbuscha*) با پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از پوست ماهی پولاک (*Theragra chalcogramma*) موجب کاهش شاخص تیوباربیتوریک‌اسید نمونه در مقابل شاهد شد (Sathivel *et al*., 2008). تحقیق حاضر نیز قصد دارد با محلول ترکیبی کیتوزان و پودر پروتئین آبکافتی، فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را پوشش داده و شاخص‌های شیمیایی و میکروبی آن را با فیله دارای پوشش کیتوزان خالص و نمونه شاهد در طول دوره نگهداری در یخچال (دمای 1±4 درجه سانتی‌گراد) مقایسه کند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی ماهی

تعدادی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن تقریبی 700 گرم از مزرعه‌ای واقع در شهرستان ساری خریداری و پس از سرزنی، تخلیه اندرونه و شستشو در یونولیت حاوی قطعات یخ به پایلوت فراوری محصولات شیلاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد. فریم (اسکلت به همراه مقدار کم گوشت متصل به آن) ماهی کپور معمولی که از آن به‌عنوان سوبسترا جهت تولید پروتئین

آبکافتی استفاده شد، از ضایعات تولید سوریمی و به صورت منجمد در آزمایشگاه موجود بود.

تولید پروتئین آبکافتی و بررسی ویژگی‌های آن

به‌منظور تولید پروتئین آبکافتی، 100 گرم فریم ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌عنوان سوبسترا در ارلن مایر 500 میلی‌لیتری ریخته و سپس 200 میلی‌لیتر بافر فسفات (با pH=7، مناسب برای فعالیت آنزیم فلاورزایم) به ارلن‌مایر اضافه شد. ظرف حاوی نمونه در انکوباتور شیکردار (Cold shaker incubator, TM 65, Iran) با دمای 50 درجه سانتی‌گراد قرار داده و آنزیم فلاورزایم به میزان 1/5 درصد وزنی میزان پروتئین سوبسترا به محلول اضافه شد. پس از اتمام فرآیند آبکافت (2 ساعت)، به‌منظور قطع واکنش آنزیمی، نمونه به مدت 15 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه بعد از خنک‌شدن تا دمای اتاق، 20 دقیقه با دور 8000g، در دمای 10 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (D-78532 Tuttlingen,Germany) و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه فریزدرایر (Vaco 2 Zirbus, Germany) خشک و پودر پروتئینی حاصل شد (Ovissipour *et al.*2010). پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت در این پودر به روش استاندارد AOAC محاسبه شد (AOAC, 2005). به‌منظور محاسبه درجه آبکافت، بعد از پایان فرایند، محلول تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) 20 درصد با نسبت برابر به مایع رویی (سوپرناتانت) افزوده شد و محلول حاصل با دور 6700g در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ گردید.

جدول 1- خصوصیات پودر آبکافتی تولیدشده

ترکیب شیمیایی (٪)					
پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر	درجه آبکافت (٪)	طول زنجیره
93/75±1/32	0/61±0/02	2/56±0/18	3/83±0/3	15/9	6/28

سپس نیتروژن موجود در سوپرناتانت جدید (محلول تری‌کلرو-استیک‌اسید 10%) به روش بیورت سنجیده و درجه آبکافت از طریق رابطه 1 محاسبه شد (Hoyle& Merritt,1994). برای رسم منحنی استاندارد و به‌دست آوردن معادله دستگاه اسپکتروفتومتر (-UV M51UV/Vis, Italy) از سرم آلبومین گاوی به‌عنوان پروتئین استاندارد استفاده گردید. نیتروژن کل در نمونه نیز با دستگاه کجلدال (Behr S4, Germany) مورد سنجش قرار گرفت.

میانگین طول زنجیره پپتیدی (PCL[1]) از طریق رابطه 2 محاسبه شد (Adler-Nissen & Olsen, 1979).

$$\text{درصد درجه آبکافت} = \frac{\text{نیتروژن موجود در محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید}}{\text{نیتروژن کل در نمونه}} \times ۱۰۰ \qquad (1)$$

(2) (درجه آبکافت/ 100)= طول زنجیره پپتیدی

مشخصات کلی پودر پروتئینی تولیدشده در جدول 1 ارائه شده است.

تهیه محلول (فیلم) کیتوزان

محلول کیتوزان با حل کردن 2 درصد وزنی/ حجمی کیتوزان (با وزن مولکولی متوسط و ویسکوزیته 200 تا CP 800) در استیک اسید 1 درصد حجمی/ حجمی تهیه شد. سپس 0/75 میلی‌لیتر گلیسرول به ازای هر گرم کیتوزان (به‌عنوان پلاستی‌سایزر) به محلول فوق اضافه و این محلول به مدت 10 دقیقه با همزن یکنواخت گردید. در نهایت به منظور حذف ناخالصی از کاغذ واتمن شماره 3 استفاده شد (اجاق و همکاران، 1391).

تهیه محلول (فیلم) کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی

این محلول با حل کردن 2 درصد وزنی/ حجمی کیتوزان (با وزن مولکولی متوسط و ویسکوزیته 200 تا CP 800) و 2 درصد وزنی/ حجمی پودر پروتئین آبکافتی (محتوی حدود 93 درصد پروتئین با درجه آبکافت 15/9درصد) در استیک اسید 1 درصد حجمی/ حجمی تهیه شد. همچنین در این محلول نیز از مقدار 0/75 میلی‌لیتر گلیسرول به ازای هر گرم کیتوزان به‌عنوان پلاستی‌سایزر استفاده گردید.

تیمارها و نحوه پوشش‌دهی

در این پژوهش 3 تیمار مورد ارزیابی‌های شیمیایی و میکروبی قرار گرفتند. تیمار اول که در واقع تیمار شاهد است و صرفا شامل فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. تیمار دوم، فیله ماهی مذکور است که با محلول کیتوزان (2 درصد وزنی/ حجمی) پوشش‌دهی شد. در تیمار سوم از محلول کیتوزان (2 درصد وزنی/ حجمی) حاوی پروتئین آبکافتی (2 درصد وزنی/ حجمی) به‌عنوان پوشش فیله استفاده گردید. پوشش‌دهی تیمارها به‌صورت غوطه‌وری و مطابق روش اجاق و همکاران (1391) انجام گرفت. فیله‌های پوشش‌دهی

1 Peptide Chain Length

شده به همراه شاهد (تیمارها) به یخچال آزمایشگاه با دمای 4 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و در بازه زمانی 20 روز در روزهای صفر، 4، 8، 12، 16 و 20 در سه تکرار مورد آنالیزهای شیمیایی و میکروبی زیر قرار گرفتند.

سنجش عدد پراکسید تیمارها (PV[2])

60 سی‌سی کلروفرم و 60 سی‌سی متانول به دکانتور حاوی 15 گرم فیله اضافه گردید. بعد از 24 ساعت با افزودن 36 سی‌سی آب مقطر به دکانتور اجازه داده شد تا سه فاز تشکیل شود. 20 میلی‌لیتر از فاز زیرین به یک ارلن منتقل و با 25 سی‌سی کلروفرم و استیک‌اسید (با نسبت 3 به 2) ترکیب شد. در مرحله بعد 0/5 سی‌سی یدور پتاسیم و 30 سی‌سی آب مقطر به ترکیب حاصل اضافه گردید. سپس 0/5 سی‌سی معرف نشاسته 1% وارد ارلن و درب آن بسته شد. بعد از تکان‌دادن ارلن، ید آزادشده رنگ محلول را تغییر داد. در انتها محلول حاصل با تیوسولفات 0/01 نرمال تیتر و عدد پراکسید از رابطه 3 بر حسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم چربی محاسبه شد.

$$\text{عدد پراکسید} = \frac{\text{نرمالیته} \times \text{حجم تیوسولفات مصرفی} \times ۱۰۰}{\text{وزن نمونه روغن}} \qquad (3)$$

اندازه‌گیری تیوباربیتوریک‌اسید (TBA[3])

برای اندازه‌گیری این شاخص 200 میلی‌گرم از نمونه به بالن 25 سی‌سی منتقل و سپس با 1- بوتانول به حجم رسانده شد. 5 سی‌سی از محلول حاصل و 5 سی‌سی معرف TBA در یک فالکون ترکیب و این فالکون‌ها به مدت 2 ساعت در حمام آب 95 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در انتها میزان جذب این محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 530 نانومتر (As) در مقابل شاهد آب (Ab) قرائت و با استفاده از رابطه 4 تیوباربیتوریک‌اسید نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید در کیلوگرم بافت نمونه محاسبه شد (Namulema *et al.*, 1999).

$$TBA = \frac{(As - Ab) \times 50}{200} \qquad (4)$$

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار (TVB-N[4])

برای اندازه‌گیری این شاخص، 10 گرم نمونه، 2 گرم منیزیم‌اکسید و 500 میلی‌لیتر آب مقطر به بالن دستگاه کلدال منتقل و عصاره آن به محلول اسیدبوریک 2 درصد و 1 قطره متیل قرمز اضافه شد. سپس محلول زرد رنگ حاصل تا ایجاد رنگ ارغوانی با اسیدسولفوریک تیتر و در انتها میزان بازهای ازته فرار بر حسب میلی‌گرم نیتروژن در 100 گرم نمونه از حاصل‌ضرب حجم اسیدسولفوریک مصرفی در عدد 14 محاسبه شد (Parvaneh, 1998).

سنجش میزان اسیدهای چرب آزاد (FFA[5])

جهت سنجش این شاخص، 2 تا 3 قطره معرف فنل‌فتالئین به یک ارلن حاوی 25 میلی‌لیتر اتانول 96% اضافه شد. این محلول با افزودن 1 تا 2 قطره سدیم هیدروکسید، خنثی و رنگ آن به رنگ پوست پیاز تغییر کرد. محلول حاصل به ارلن حاوی چربی که حاصل تبخیر حلال مابقی فاز پائینی دکانتور است، اضافه و روی هیتر قرار گرفت. پس از اولین جوش، محلول از هیتر جدا و 2 تا 3 قطره فنل‌فتالئین به آن افزوده و سپس با سود تیتر و اسیدهای چرب آزاد بر حسب درصد اولئیک اسید از رابطه 5 محاسبه شد (Egan & Sawyer, 1997). در این رابطه N، نرمالیته سود، V_2، میلی‌لیتر سود مصرفی برای هر نمونه، V_1، میلی‌لیتر سود مصرفی برای هر نمونه شاهد و W، گرم چربی است.

$$FFA = \frac{N \times (V2 - V1) \times 2.82}{W} \qquad (5)$$

سنجش pH

جهت سنجش pH، 5 گرم نمونه با 45 سی‌سی آب مقطر به مدت یک دقیقه مخلوط و میزان pH با دستگاه pHمتر (WTW 7110) اندازه‌گیری شد (Sallam *et al.*, 2007).

آنالیز میکروبی (باکتری‌های مزوفیل هوازی[6] و باکتری‌های سرماگرا[7])

به‌منظور شمارش بارکتریایی تیمارها در طول دوره نگهداری، در ابتدا 10 گرم نمونه در شرایط کاملا استریل در 90 میلی‌لیتر سدیم‌کلرید 0/9 درصد هموژن شد. سپس از این محلول، رقت‌های متوالی تهیه و یک میلی‌لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها به روش پورپلیت[8] در محیط پلیت کانت آگار (PCA[9]) قرار گرفت. جهت شمارش باکتری‌های مزوفیل، این نمونه‌ها به مدت 48 ساعت در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. این دما و زمان برای شمارش باکتری‌های سرماگرا به‌ترتیب 10 درجه سانتی‌گراد و 7 روز بود. بعد اتمام انکوباسیون تعداد کلنی‌ها شمارش و به‌صورت Log10 CFU /g گزارش شدند (Sallam *et al.*, 2007).

2 . Proxide value
3 Thiobarbituric acid
4 Total volatile basic-nitrogen

5 Free Fatty Acids
6 Mesophilic bacteria counts
7 Psychrophilic bacteria counts
8 Pour plate
9 Plate Count Agar

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا و به‌منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) آنالیز شده و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان 95 درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

عدد پراکسید

عدد پراکسید شاخصی جهت تشخیص میزان هیدروپراکسیدها که محصولات اولیه اکسیداسیون چربی‌ها هستند، می‌باشد. مطابق جدول 2 عدد پراکسید در روزهای صفر و 4 در سه تیمار تفاوت معنی‌داری ندارد (p>0/05). در روز 8 عدد پراکسید در تیمارهای 2 و 3 (p>0/05) با تیمار 1 اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه کرد (p<0/05). در روز 12 این شاخص در تیمار 3 به‌صورت معنی‌داری کمتر از تیمارهای 1 و 2 (p>0/05) بود (p<0/05). در روزهای 16 و 20 بین اعداد پراکسید سه تیمار اختلاف معنی‌داری وجود داشت و کمترین این شاخص در تیمار 3 ثبت شد (p<0/05).

مطابق نتایج، پوشش کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی توانست به‌صورت فعال‌تری با اکسیداسیون و تولید هیدروپراکسیدها مقابله کند. احتمالا فیلم کیتوزانی حاوی پروتئین آبکافتی نسبت به فیلم خالص کیتوزان، قدرت بیشتری در برابر نفوذ اکسیژن دارد.

در این مطالعه روند افزایش تغییرات پراکسید در هر سه تیمار تا روز 16 افزایشی بود اما در روز 20 در هر سه تیمار این شاخص نسبت به روز 16 کاهش یافت. گرچه این کاهش در تیمار 3 معنی‌دار نبود (p>0/05). این نتیجه در مطالعه زرگر و همکاران (1393) و جدی و همکاران (1395) نیز مشاهده شد. دلیل این کاهش احتمالا مربوط به تبدیل‌شدن پراکسیدها به ترکیبات ثانویه اکسیداسیونی مانند کربونیل‌ها با افزایش دوره نگهداری است (اعتمادی، 1387).

جدول 2- تغییرات عدد پراکسید در تیمارها (بر حسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم چربی)

روز	تیمارها (نوع پوشش) شاهد (1)	کیتوزان (2)	کیتوزان+ پروتئین آبکافتی (3)
0	1/42±0/18^{Aa}	1/38±0/55^{Aa}	1/26±0/38^{Aa}
4	2/93±0/44^{Ba}	2/76±0/59^{Ba}	2/68±0/48^{Ba}
8	4/47±0/3^{Cb}	2/61±0/22^{Ba}	2/41±0/21^{Ba}
12	4/75±0/9^{Cb}	4/11±0/25^{Cb}	2/72±0/58^{Ba}
16	7/91±0/11^{Ec}	6/48±0/29^{Eb}	4/42±0/33^{Ca}
20	6/84±0/01^{Dc}	5/54±0/08^{Db}	4/12±0/17^{Ca}

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ردیف است (p<0/05).
حروف بزرگ متفاوت در هر ستون، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ستون است (p<0/05).

شاخص تیوباربیتوریک اسید

تیوباربیتوریک‌اسید، شاخص سنجش اکسیداسیون چربی‌ها و در واقع میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید تولیدشده در یک کیلوگرم نمونه است که در پایان اکسیداسیون چربی‌ها تولید می‌شود. در مواد غذایی با کیفیت بالا، خوب و قابل مصرف، میزان این شاخص به‌ترتیب باید کمتر از 3، 5 و 8 میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید در کیلوگرم باشد (Schormuller, 1969). در مورد فراورده‌های شیلاتی میزان تیوباربیتوریک‌اسید کمتر از 3 میلی‌گرم در کیلوگرم نمونه قابل قبول است (Cadun *et al*., 2005) و افزایش این شاخص منجر به ایجاد بو و عطر نامطبوع در این فراورده‌ها می‌شود. جدول 3 شاخص تیوباربیتوریک‌اسید تیمارها را نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، در روزهای صفر، 4 و 8 میزان این شاخص در سه تیمار اختلاف معنی‌داری ندارد (p>0/05). در روز 12، کمترین میزان شاخص تیوباربیتوریک‌اسید مربوط به تیمار 3 بود (p<0/05) اما در دو تیمار 1 و 2 اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>0/05). قدرت آنتی‌اکسیدانی پوشش‌ها در دو تیمار 2 و 3 در روزهای 16 و 20 اثرگذاری خود را به وضوح نشان داد. در این دور روز، میزان شاخص تیوباربیتوریک اسید در تیمار 2 نسبت به تیمار 1 و در تیمار 3 نسبت به تیمارهای 1 و 2 به‌طور معنی‌داری کمتر بود (p<0/05) که این موضوع نشان می‌دهد ترکیب کیتوزان و پروتئین آبکافتی جهت جلوگیری از فرایند اکسیداسیون کاراتر از کیتوزان خالص است. در مطالعه جدی و همکاران (1395) پوشش کیتوزان حاوی مرزنجوش در روز 14 نسبت به پوشش کیتوزان خالص و نمونه شاهد (فیله قزل‌آلا) به‌صورت معنی‌داری تیوباربیتوریک‌اسید کمتری نشان داد. در پژوهش حاضر با افزایش زمان نگهداری، شاخص تیوباربیتوریک اسید در هر سه تیمار روند افزایشی از خود نشان داد. در مطالعات زرگر و همکاران

(1393) و آلبوغبیش و خدانظری (1396) نیز روند افزایشی شاخص مذکور با افزایش زمان نگهداری مشاهده شد. بر خلاف تحقیق حاضر، روند دائم و مستمر افزایش تیوباربیتوریک اسید در طول نگهداری ماهی شوریده با پوشش کیتوزان- ژلاتین مشاهده نشد (ساکی و همکاران، 1396).

جدول 3- شاخص تیوباربیتوریک اسید در تیمارها (برحسب میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید در کیلوگرم نمونه)

روز	تیمارها (نوع پوشش)		
	شاهد (1)	کیتوزان (2)	کیتوزان+ پروتئین آبکافتی (3)
0	0/017±0/06 Aa	0/015±0/07 Aa	0/014±0/04 Aa
4	0/031±0/01 Aa	0/029±0/01 Aa	0/028±0/07 Aa
8	0/068±0/02 Aa	0/051±0/04 Aa	0/042±0/02 Aa
12	0/59±0/05 Bb	0/56±0/01 Bb	0/18±0/01 Ba
16	1/31±0/15 Cc	0/62±0/06 Bb	0/21±0/02 Ba
20	1/49±0/02 Cc	0/99±0/02 Cb	0/52±0/1 Ca

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ردیف است ($p<0/05$).
حروف بزرگ متفاوت در هر ستون، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ستون است ($p<0/05$).

بازهای ازته فرار

بازهای ازته فرار حاصل فساد و تجزیه مولکول‌های پروتئینی و آمینواسیدها هستند که در پی فعالیت‌های میکروبی و آنزیم‌های اتولیتیک بافت ماهی تولید می‌شوند. آمونیاک، آمونیوم، مونومتیل‌آمین، دی‌متیل‌آمین، تری‌متیل‌آمین، نوکلئوتیدها و... از دسته بازهای ازته فرار هستند که تجمع آن‌ها در بافت ماهی ویژگی‌های کیفی محصول به‌خصوص عطر، طعم و مزه را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Huss, 1995; Goulas & Kontominas, 2007; EL- Deen& EL-Shamery, 2010; Duan *et al.*, 2010).

جدول 4– بازهای ازته فرار در تیمارها (بر حسب میلی‌گرم نیتروژن در 100 گرم نمونه)

روز	تیمارها		
	شاهد (1)	کیتوزان (2)	کیتوزان+ پروتئین آبکافتی (3)
0	13/36±1/18 Aa	13/18±0/23 Aa	12/46±1/28 Aa
4	15/28±2/44 Aa	14/62±1/51 Aa	13/05±0/21 Aa
8	23/08±0/53 Bc	17/41±0/11 Bb	13/22±0/48 Aa
12	29/86±1/9 Cc	21/51±0/22 Cb	15/25±0/71 Ba
16	35/16±2/01 Dc	25/74±0/61 Db	15/52±1/12 Ba
20	43/36±0/41 Ec	30/19±0/54 Eb	22/11±0/15 Ca

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ردیف است ($p<0/05$).
حروف بزرگ متفاوت در هر ستون، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ستون است ($p<0/05$).

جدول 4 میزان شاخص بازهای ازته فرار را در تیمارهای مورد بررسی نشان می‌دهد. در طول دوره نگهداری، به غیر از روزهای صفر و 4، مقادیر بازهای ازته فرار بین تیمارها با هم اختلاف معنی‌داری دارند ($p<0/05$) و کمترین این مقادیر مربوط به تیمار 3 می‌باشد. در این تیمار، ترکیب کیتوزان و پروتئین آبکافتی آنقدر سد محکمی در برابر فعالیت باکتری‌ها ایجاد کرد که میزان بازهای ازته فرار تا روز 16، اختلاف چندانی با یکدیگر ندارند. در تیمارهای 1 و 2 با افزایش زمان نگهداری از روز 4 به بعد، میزان بازهای ازته فرار با شدت زیاد و به صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p<0/05$).

در تیمار شاهد، میزان بازهای ازته فرار در روزهای 12، 16 و 20 از حد مجاز که در واقع 25 میلی‌گرم نیتروژن در 100 گرم نمونه است (Gimenez *et al*, 2002; Kilincceker *et al*., 2009) عبور کرده است. حتی اگر حداکثر مجاز این شاخص 35-30 میلی‌گرم نیتروژن در 100 گرم نمونه لحاظ شود (Jeya *et al*., 2005) باز هم در روزهای پایانی تیمار شاهد قابل مصرف نیست. در تیمار 2 نیز با وجود

کیتوزان به‌عنوان ضدباکتری و آنتی‌اکسیدان، در روزهای 16 و 20 مقدار بازهای ازته فرار از 25 میلی‌گرم نیتروژن در 100 گرم نمونه فراتر رفت. اما در تیمار 3، ترکیب کیتوزان و پروتئین آبکافتی مانع از افزایش بیش از حد بازهای ازته فرار در کل دوره و عبور از حداکثر مقادیر مجاز شد.

در پژوهش جدی و همکاران (1395) کیتوزان و محلول کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش در طول دوره نگهداری فیله ماهی قزل‌آلا به‌صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مقادیر کمتری از بازهای ازته فرار را ارائه کردند. ضمن اینکه مانند پژوهش حاضر میزان شاخص مذکور با افزایش زمان نگهداری، به صورت مستمر افزایش یافت. اجاق و همکاران (1389) اثرگذاری پوشش کیتوزان و کیتوزان حاوی اسانس دارچین را در کندکردن روند افزایش بازهای ازته فرار ثابت کردند. سایر مطالعات مشابه مانند Lopez-Caballero و همکاران (2005) و Joen و همکاران (2002) نیز بر خواص کیتوزان در کنترل روند تولید بازهای ازته فرار تاکید کردند.

اسیدهای چرب آزاد

اسیدهای چرب آزاد حاصل تجزیه گلیسریدها، گلیکولیپیدها و فسفولیپیدها توسط عوامل میکروبی و آنزیمی (لیپازها و فسفولیپازها) هستند. هیدرولیز چربی‌ها و تولید اسیدهای چرب آزاد به تنهایی منجر به کاهش کیفیت (نامطلوب‌شدن بو و طعم) و سلامت ماده غذایی نمی‌شوند اما از آنجا که این اسیدها اندازه و وزن مولکولی کمتری نسبت به سوبسترای اولیه (تری‌گلیسریدها و فسفولیپیدها) دارند، سرعت اکسیداسیون آن‌ها بیشتر است و در واقع این عمل را تشدید می‌کنند (Losada *et al*., 2007; Hamilton *et al*., 1997; Aubourg, 2001). همچنین هیدرولیز چربی‌ها بر دناتوره‌شدن پروتئین‌ها تاثیر شدیدی دارد (Aubourg *et al*., 2005).

جدول 5 روند تغییرات اسید چرب آزاد را در تیمارها نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، در روزهای صفر و 4 بین سه تیمار از نظر مقادیر شاخص مذکور، اختلاف قابل ملاحظه‌ای ثبت نشد ($p>0/05$). در روزهای 8 و 12 نیز بین تیمارهای 2 و 3 از نظر میزان اسیدهای چرب آزاد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). اما در روزهای 16 و 20 هر سه تیمار مقادیر مختلفی از میزان اسیدهای چرب ارائه کردند که کمترین مقادیر مربوط به تیمار 3 بود ($p<0/05$). این نتایج نشان داد که پوشش کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی نسبت به کیتوزان خالص قدرت بیشتری در جلوگیری از فعالیت‌های میکروبی- آنزیمی منجر به تولید اسیدهای چرب آزاد دارد.

به‌طورکلی در هر سه تیمار، مقادیر اسیدهای چرب آزاد با افزایش زمان نگهداری افزایش یافته است، گرچه اختلاف این مقادیر در هر تیمار بین برخی از روزها معنی‌دار نبود ($p>0/05$). در مطالعه ساکی و همکاران (1396) هم، این روند افزایشی و همچنین اثر پوشش کیتوزان- ژلاتین در کنترل تولید اسیدهای چرب آزاد ثابت شد. در مطالعه‌ای دیگر میزان اسیدهای چرب آزاد فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای پوشش کیتوزان- اسانس دارچین در مقایسه با شاهد به شکل معنی‌داری کمتر بود (اجاق، 1389).

جدول 5- تغییرات اسیدهای چرب آزاد در تیمارها (بر حسب درصد اولئیک اسید)

روز	تیمارها (نوع پوشش)		
	شاهد (1)	کیتوزان (2)	کیتوزان+ پروتئین آبکافتی (3)
0	0/16±0/13Aa	0/14±0/09Aa	0/12±0/06Aa
4	0/26±0/06Aa	0/22±0/01ABa	0/19±0/05Aa
8	0/97±0/02Bb	0/4±0/04Ba	0/25±0/02Aa
12	1/11±0/05Bb	0/71±0/01Ca	0/58±0/21Ba
16	1/79±0/04Cc	0/99±0/06Db	0/58±0/02Ba
20	2/55±0/07Dc	1/76±0/12Eb	0/98±0/1Ca

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ردیف است ($p<0/05$).
حروف بزرگ متفاوت در هر ستون، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ستون است ($p<0/05$).

باکتری‌های مزوفیل هوازی

جدول 6 روند تغییرات تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی را نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، با افزایش دوره نگهداری، در همه تیمارها تعداد باکتری‌های مذکور به صورت معنی‌داری افزایش یافته‌اند ($p<0/05$). مطابق جدول، فقط در روز صفر بین تیمار 1 و 2 از نظر تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). اما در بقیه روزها، تعداد باکتری‌های مذکور در هر سه تیمار به‌صورت قابل ملاحظه‌ای با

یکدیگر متفاوت بودند (p<0/05) و کمترین نرخ رشد و تعداد باکتری در تیمار 3 ثبت شد. در اینجا هم قویا می‌توان ادعا کرد که ترکیب کیتوزان و پروتئین آبکافتی، پوششی ایجاد کرد که به مراتب قدرت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به فیلم کیتوزان خالص دارد. Sila و همکاران (2014) فعالیت ضدباکتریایی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز عضله ماهی *Barbus callensis* را علیه باکتری‌های *listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Enterococcus faecali*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Salmonella enterica*، *Enterobacter sp* ثابت کردند.

بار باکتریایی یک ماده غذایی، بسیاری از خواص شیمایی مرتبط با اکسیداسیون و فساد را تعیین می‌کند. حداکثر مقدار مجاز بار باکتریایی مزوفیل برای مصارف انسانی $7 \ Log_{10} \ CFU/g$ است (Koutsoumanis, 1999). در این تحقیق، در روز پایانی تعداد باکتری‌های مذکور در تیمار شاهد از حد مجاز گذشته و برای مصرف مناسب نیست. اما در تیمارهای 2 و 3 پوشش کیتوزان و کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی، مانع از رشد و تکثیر باکتری‌ها و عبور از حد مجاز در کل دوره شده است.

جدول 6- شمارش بار باکتریایی مزوفیل هوازی در تیمارها در طول مدت نگهداری در یخچال (Log_{10} CFU /g)

روز	تیمارها (نوع پوشش)		
	شاهد (1)	کیتوزان (2)	کیتوزان+ پروتئین آبکافتی (3)
0	$3/01 \pm 0/05^{Ab}$	$2/96 \pm 0/04^{Ab}$	$2/21 \pm 0/01^{Aa}$
4	$3/99 \pm 0/02^{Bc}$	$3/29 \pm 0/01^{Bb}$	$2/39 \pm 0/06^{Ba}$
8	$5/91 \pm 0/07^{Cc}$	$4/26 \pm 0/03^{Cb}$	$2/93 \pm 0/05^{Ca}$
12	$6/85 \pm 0/04^{Dc}$	$4/95 \pm 0/1^{Db}$	$3/56 \pm 0/02^{Da}$
16	$7/39 \pm 0/09^{Ec}$	$5/68 \pm 0/05^{Eb}$	$4/35 \pm 0/03^{Ea}$
20	$8/25 \pm 0/2^{Fc}$	$6/31 \pm 0/1^{Fb}$	$5/12 \pm 0/01^{Fa}$

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ردیف است (p<0/05).
حروف بزرگ متفاوت در هر ستون، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ستون است (p<0/05).

باکتری‌های سرمادوست

روند تغییرات بار باکتری‌های سرمادوست تیمارها در جدول 7 ارائه شده است. در روزهای صفر و 4 تعداد باکتری‌های سرمادوست در تیمارهای 2 و 3 اختلاف معنی‌داری نشان نداد (p>0/05). اما در روزهای 8، 12، 16و 20 تعداد باکتری‌های مذکور در هر سه تیمار اختلاف معنی‌داری داشتند و کمترین نرخ و سرعت رشد باز هم در تیمار 3 که از پوشش کیتوزان و پروتئین آبکافتی استفاده شده بود، ثبت شد (p<0/05).

جدول 7- شمارش بار باکتریایی سرمادوست در تیمارها در طول مدت نگهداری در یخچال (Log10 CFU /g)

روز	تیمارها (نوع پوشش)		
	شاهد (1)	کیتوزان (2)	کیتوزان+ پروتئین آبکافتی (3)
0	$2/91 \pm 0/01^{Ab}$	$2/42 \pm 0/22^{Aa}$	$2/39 \pm 0/16^{Aa}$
4	$3/83 \pm 0/02^{Bb}$	$2/81 \pm 0/19^{Ba}$	$2/76 \pm 0/05^{Ba}$
8	$4/98 \pm 0/07^{Cc}$	$3/64 \pm 0/1^{Cb}$	$2/95 \pm 0/06^{Ca}$
12	$7/67 \pm 0/11^{Dc}$	$4/96 \pm 0/14^{Db}$	$3/45 \pm 0/09^{Da}$
16	$8/52 \pm 0/03^{Ec}$	$5/73 \pm 0/08^{Eb}$	$4/12 \pm 0/04^{Ea}$
20	$11/41 \pm 0/31^{Fc}$	$6/39 \pm 0/21^{Fb}$	$4/97 \pm 0/05^{Fa}$

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ردیف است (p<0/05).
حروف بزرگ متفاوت در هر ستون، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ستون است (p<0/05).

در هر سه تیمار با افزایش زمان نگهداری، به‌طور معنی‌داری تعداد باکتری‌های سرمادوست افزایش یافت ($p<0/05$). در مطالعه اجاق و همکاران (1391) پوشش فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با کیتوزان و کیتوزان حاوی اسانس دارچین تا حد زیادی توانست روند رشد و تکثیر باکتری‌های سرمادوست را نسبت به شاهد طی دوره نگهداری در یخچال کندتر کند. در پژوهش مذکور نیز مانند تحقیق حاضر با افزایش روزهای نگهداری، در همه تیمارها تعداد باکتری‌های سرمادوست افزایش یافتند. شمارش باکتری‌های سرماگرا در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با پوشش‌های کیتوزان و کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش در طول دوره نگهداری در یخچال، روند افزایشی تعداد باکتری‌ها با افزایش زمان نگهداری و کاهش رشد و تکثیر آن‌ها را نسبت به شاهد نشان داد (جدی و همکاران، 1395). در تحقیق ساکی و همکاران (1396)، فیله ماهی شوریده پوشش داده شده با فیلم ترکیبی کیتوزان- ژلاتین در طول نگهداری در یخچال تعداد باکتری‌های سرمادوست کمتری را نسبت به نمونه شاهد نشان داد و مانند مطالعه حاضر روند افزایشی این باکتری‌ها در طول دوره نگهداری در همه تیمارها ثبت شد.

تغییرات pH

مطابق جدول 8، در تیمارهای 1 و 2 روند تغییرات pH در طول دوره نگهداری افزایشی است. اما این روند در تیمار 3 رویت نشد و هیچ اختلاف معنی‌داری بین مقادیر pH در طول روزهای نگهداری وجود نداشت ($p>0/05$). روند افزایشی pH با افزایش زمان نگهداری را می‌توان حاصل افزایش فعالیت باکتری‌های اتولیتیک و پروتئولیتیک در طول دوره نگهداری و فساد میکروبی- آنزیمی توسط آن‌ها که منجر به تولید مواد افزایش‌دهنده pH مانند آمونیوم، آمونیاک، تری‌متیل‌آمین می‌شود دانست (Kilincceker *et al*, 2009). با همین استدلال می‌توان ثبات و پایداری pH را در تیمار 3 در طول دوره نگهداری توجیه کرد. به این صورت که با افزایش زمان نگهداری، پوشش کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی توانسته تا حد زیادی مانع از فعالیت باکتری‌ها و تولید ترکیبات فرار افزایش‌دهنده pH شود.

در روزهای 12، 16 و 20 مقدار pH در تیمار 3 نسبت به تیمارهای 1 و 2 به صورت معنی‌داری کمتر بود ($p<0/05$) که این موضوع نشان می‌دهد پوشش کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی نسبت به کیتوزان خالص خاصیت ضدباکتریایی قوی‌تری از خود نشان داده است.

در تحقیق Fan و همکاران (2009) نیز مانند تحقیق حاضر روند افزایشی pH با افزایش زمان نگهداری مشاهده و همچنین اثر کیتوزان در کندترکردن سرعت افزایش pH ثابت شد. در پژوهش اجاق و همکاران (1391) بر خلاف تحقیق حاضر، روند دائم افزایشی pHدر تیمارها (شاهد، فیله پوششی با کیتوزان، فیله پوششی با کیتوزان حاوی اسانس دارچین) با افزایش دوره نگهداری ثبت نشد.

جدول 8- تغییرات pH در طول دوره نگهداری در تیمارهای مختلف

	تیمارها (نوع پوشش)		
روز	شاهد (1)	کیتوزان (2)	کیتوزان+ پروتئین آبکافتی (3)
0	6/11±0/05Aa	6/19±0/18Aa	6/12±0/11Aa
4	6/57±0/01Bb	6/23±0/12Aab	6/15±0/14Aa
8	6/94±0/02Cb	6/38±0/05Aa	6/18±0/18Aa
12	7/01±0/29Cb	6/88±0/09Bb	6/28±0/05Aa
16	7/52±0/03Dc	6/91±0/04Bb	6/29±0/04Aa
20	7/73±0/11Dc	7/04±0/09Bb	6/36±0/19Aa

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ردیف است ($p<0/05$).
حروف بزرگ متفاوت در هر ستون، نشانه وجود اختلاف معنادار بین داده‌های آن ستون است ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، ترکیب کیتوزان با پروتئین آبکافتی تولیدشده از فریم ماهی کپور معمولی (با آنزیم میکروبی فلاورزایم و درجه آبکافت 15/9 درصد) منجر به تشدید خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی پوشش (فیلم) کیتوزان شد. به‌گونه‌ای که فیلم حاصل از ترکیب کیتوزان و پروتئین آبکافتی مذکور نسبت به فیلم کیتوزان خالص به مراتب مانع قوی‌تری در برابر اکسیداسیون چربی‌ها و تکثیر باکتری‌ها در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (ذخیره‌شده در دمای یخچال) بود.

تشکر و قدردانی

محققین این تحقیق بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جهت در اختیار قراردادن تجهیزات و آزمایشگاه‌های تخصصی تقدیر و تشکر نمایند.

منابع

اعتمادی ح. رضایی م. عابدیان کناری ع. (1387). پتانسیل آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره رزوماری (*Rosmarinus officinalis*) در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علوم و صنایع غذایی، 5 (19): 77-67.

اجاق س م. 1389. تاثیر استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان غنی‌شدده با اسانس دارچین بر کیفیت و ماندگاری فیله سرشده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان‌نامه دکتری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس

اجاق س م. رضایی م. رضوی س ه. حسینی س م ه. 1391. اثر پوشش‌های آنتی‌میکروبی در افزایش ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علوم و صنایع غذایی، 34 (9): 23-13.

آلبوغبیش ح و خدانظری آ. 1396. مقایسه تاثیر پوشش‌های کیتوزان و نانوکیتوزان غنی‌شده با عصاره چای سبز (*Camellia sinensis L.*) بر کیفیت ماهی گیش درخشان (*Carangoides coeruleopinnatus*) طی نگهداری در یخچال. مجله علمی شیلات ایران، 26 (5): 110-95.

بخشان ع.، علیزاده دوغیکلایی ا.، طاهری ع. 1393. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی بدست آمده از ضایعات، در فرایند فیله کردن ماهی آزاد (*Salmo salar*). پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، سال یازدهم، شماره 1، 1152-1143

جدی س. یگانه س. جعفرپور س ع. ناصری م. 1395. تاثیر پوشش خوراکی کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgare L.*) بر ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، 11 (1): 38-24.

ریحانی س. جعفرپور س ع. 1396. اثر درجه آبکافت بر خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از فریم و سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). فصلنامه علوم وصنایع غذایی، 68 (14): 124-113.

ریحانی س. جعفرپور س ع. صفری ر. 1397. بررسی پروفیل اسیدچرب روغن، خواص کارکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین حاصله از آبکافت آنزیمی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم‌های پروتامکس و نئوتراز. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، 14 (1): 176-162.

زرگر م. یگانه س. رضوی س ه. اجاق س م. 1393. تاثیر پوشش خوراکی کازئینات سدیم بر کیفیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه علوم و صنایع غذایی، 44 (11): 81-71.

ساکی ج. خدانظری آ. تاثیر پوشش و فیلم مخلوط خوراکی کیتوزان-ژلاتین بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی ماهی شوریده بلانگر نگهداری‌شده در یخچال. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، 6 (1): 86-71.

طاهری ع .، بیتا س. 1389. خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده احشای ماهی یال اسبی (*Trichiurus lepturus*) تولید شده با آنزیم پروتامکس. طرح پژوهشی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به شماره 48/1632

علی‌نژاد م. معتمدزادگان ع. رضایی م. 1395. خواص کاربردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*). فصلنامه علوم وصنایع غذایی، 50 (13): 169-159.

Adler-Nissen, J., & Olsen, H. S. (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein.

AOAC, W. H. (2005). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA

Amissah, J. (2012). Bioactive Properties of Salmon Skin Protein Hydrolysates (Doctoral dissertation, McGill University Libraries).

Aubourg, S. P. (2001). Fluorescence study of the pro-oxidant effect of free fatty acids on marine lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(4), 385-390.

Aubourg, S. P., Rodríguez, A., & Gallardo, J. M. (2005). Rancidity development during frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*): effect of catching season and commercial presentation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(5), 316-323.

Cadun, A., Cakli, S., & Kisla, D. (2005). A study of marination of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) and its shelf life. *Food Chemistry*, 90(1-2), 53-59.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food chemistry*, 107(4), 1485-1493.

Duan, J., Jiang, Y., Cherian, G., & Zhao, Y. (2010). Effect of combined chitosan-krill oil coating and modified atmosphere packaging on the storability of cold-stored lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets. *Food Chemistry*, 122(4), 1035-1042.

Da Rocha, M., Alemán, A., Romani, V. P., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Montero, P., & Prentice, C. (2018). Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. *Food hydrocolloids*, 81, 351-363.

Egan, H., & Sawyer, R. (1997). Pearson's chemical Analysis of food. 9th. Edition, Edinburgh, Scotland, Churchill. Livingstone, UK, 609-634.

El-Deen, G., & El-Shamery, M. R. (2010). Studies on contamination and quality of fresh fish meats during storage. *Academic journal of biological science*, 2, 65-74.

Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., & Shamasundar, B. A. (2014). Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by the nature of enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 1207-1214.

Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., & Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food chemistry*, 115(1), 66-70.

Gimenez, B., Roncales, P., & Beltran, J. A. (2002). Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10), 1154-1159.

Goulas, A. E., & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 100(1), 287-296.

Hoyle, N. T., & Merritt, J. O. H. N. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1), 76-79.

Huss, H. H. (Ed.). (1995). Quality and quality changes in fresh fish (Vol. 348). Rome: FAO.

Hamilton, R. J., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F. B., & Pierce, H. (1997). Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry*, 60(2), 193-199.

Jeon, Y. J., Kamil, J. Y., & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(18), 5167-5178.

Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219(1), 20-26.

Jeya, S. R., Jeyasekaran, G., & Vijayalakshmi, S. K. (2005). Effect of vacuum packaging on the quality characteristics of seer fish (*Scomberomorus commersonii*) chunks during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 42(5), 438-443.

Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., & Nychas, G. J. E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15 C. *Journal of food protection*, 62(4), 398-402.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, 102(4), 1317-1327.

Kilincceker, O., Dogan, I. S., & Kucukoner, E. (2009). Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT-Food science and technology*, 42(4), 868-873.

Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9.

Lopez-Caballero, M. E., Gomez-Guillen, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food hydrocolloids*, 19(2), 303-311.

Losada, V., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. P. (2007). Rancidity development in frozen pelagic fish: Influence of slurry ice as preliminary chilling treatment. *LWT-Food Science and Technology*, 40(6), 991-999.

Li, T., Hu, W., Li, J., Zhang, X., Zhu, J., & Li, X. (2012). Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Control*, 25(1), 101-106.

Mohan, C. O., Ravishankar, C. N., Lalitha, K. V., & Gopal, T. S. (2012). Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 167-174.Chicago

Morais Lima, M., Bianchini, D., Guerra Dias, A., da Rosa Zavareze, E., Prentice, C., & da Silveira Moreira, A. (2017). Biodegradable films based on chitosan, xanthan gum, and fish protein hydrolysate. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(23).

Namulema, A., Muyonga, J. H., & Kaaya, A. N. (1999). Quality deterioration in frozen Nile perch (*Lates niloticus*) stored at− 13 and− 27° C. *Food Research International*, 32(2), 151-156.

No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of food science*, 72(5), R87-R100.

Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R., & Motamedzadegan, A. (2010). Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using alcalase and protamex. *International Aquatic Research*, 2, 87-95.

Parvaneh, V., 1998. Quality control and the chemical analysis of food. Tehran University Press, 325P.

Peniche, C., Argüelles-Monal, W., & Goycoolea, F. M. (2008). Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. In Monomers, polymers and composites from renewable resources (pp. 517-542). Elsevier.

Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001). Residual effect of CO2 on hake (*Merluccius merluccius L.*) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, 212(4), 413-420.

Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2007). Effect of iced storage of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) on the chemical composition, properties and acceptability of Som-fug, a fermented Thai fish mince. *Food Chemistry*, 102(1), 270-280.

Schormüller J., 1969. Handbuch der Lebensmittelchemie (Band III/2). Triesrische Lebensmittel Eier, Fleisch, Fisch, Buttermich Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany/New York, USA. 1584P.

Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food control*, 18(5), 566-575.

Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 187.

Sathivel, S., Huang, J., & Bechtel, P. J. (2008). Properties of pollock (*Theragra chalcogramma*) skin hydrolysates and effects on lipid oxidation of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during 4 months of frozen storage. *Journal of food biochemistry*, 32(2), 247-263.

Shahidi, F. and Zhong Y., 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4): 914-931

Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M.,... & Bougatef, A. (2014). Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 183-188.

Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research international*, 36(9), 949-957.

Zarei, M., Ramezani, Z., Ein-Tavasoly, S., & Chadorbaf, M. (2015). Coating effects of orange and pomegranate peel extracts combined with chitosan nanoparticles on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Journal of food processing and preservation*, 39(6), 2180-2187.

Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Vol. 16, No. 4, Oct- Nov 2020, p. 493-505

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 4، مهر - آبان 1399، ص. 505-493

Effect of edible active film of chitosan containing fish protein hydrolysate (FPH) on chemical and microbial properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during the refrigerated storage

S. Reyhani Pool[1], S. A. Jafarpour[2*]

Received: 2019.07.30
Accepted: 2019.10.05

Introduction: Following extensive research on antibacterial and antioxidant properties of chitosan and hydrolyzed proteins and their satisfactory results, the use of these compounds as natural preservatives and good alternative to antibacterials and synthetic antioxidants in various nutrients is essential. The aim of the present study was to investigate the properties of chitosan coating containing FPH in the preservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets at refrigerated temperatures.

Materials and methods: The hydrolyzed protein powder (FPH) used in this study was produced by enzymatic hydrolysis of frame (skeleton with the meat attached to it) of common carp (*Cyprinus carpio*) with flavourzyme enzyme. Accordingly, this powder was added to the chitosan coating (2% w/v chitosan + 2% w/v FPH). In order to investigate antibacterial and antioxidant properties of chitosan coating containing FPH, rainbow trout fillets were coated with chitosan (treatment 2) and chitosan containing FPH (treatment 3). Then, these sample treatments and control (treatment 1) were subjected to chemical (PV, TVN-B, TBA, FFA and pH) and microbial (count of aerobic mesophilic and psychrophilic bacteria) tests on days 0, 4, 8, 12, 16 and 20 in refrigerated storage. This study was implemented in form of completely randomized design and data were analyzed by one-way ANOVA and significant differences between the means were tested by Duncan's test at 95 confidence level.

Results and discussion: According to the chemical tests, TBA, TVN-B and FFA indices showed an increasing value during the refrigeration period significantly ($P<0.05$) while their trend was lower in treatment 3 compared to the treatments 1 and 2. TBA index for treatments 1, 2 and 3 in day 0 was 0.017, 0.015 and 0.014 mg MDA/kg fillet respectively that this amounts reached to 1.49, 0.99 and 0.52 mg MDA/kg in day 20. At the beginning of the preservation period, TVN-B index was calculated 13.36, 13.18 and 12.46 mgN/100gr fillet for treatments 1, 2 and 3, respectively. But these values changed to 43.36, 30.19 and 22.11 mgN/100gr fillet for mentioned treatments at the end of preservation period. FFA index was 0.16, 0.14 and 0.12 percentage of oleic acid for treatments 1, 2 and 3 in day 0 whereas after 20 days of storage, this index increased to 2.55, 1.76 and 0.98 percentage of oleic acid for mentioned treatments respectively. The PV index was significantly less in treatment 3 compared to the treatments 1 and 2 in days 12, 16 and 20 (2.72, 4.42 and 4.12 meq o_2/kg lipid respectively) but continuous incremental trend was not recorded in this index with increasing preservation time, even the end of the experimental period (day 20), the index decreased in all of treatments compared to the 16th day. The results of pH changes showed the stability of this index in treatment 3 during the preservation period (pH~6.30). Meanwhile, in day 12, 16 and 20, the pH of treatment 3 was significantly less than treatments 1 and 2 ($p<0.05$). The bacterial load count of aerobic mesophilic and psychrophilic bacteria in treatments (while having an increasing trend during the preservation period) showed that in day 8, 12, 16 and 20, the bacterial levels of treatment 3 were significantly less than treatments 1 and 2 ($p<0.05$). In this study, adding FPH produced from common carp fish (with degree of hydrolysis 15.9%) to chitosan resulted in enhanced antioxidant and antibacterial properties of chitosan coating. So that, the film obtained from the combination of chitosan and FPH was much stronger barrier against lipids oxidation and bacterial proliferation in rainbow trout fillets (at refrigerated temperatures) than pure chitosan film.

Keywords: FPH, Chitosan, Antibacterial properties, Antioxidant properties

1. Ph.D student, Department of Seafood Science and Technology, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
2. Associate Prof. Department of Fisheries (Seafood Science and Technology), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU)
(*- Corresponding Author Email: a.jafarpour@gmail.com)